

CHEMICALLY MODIFIED, GRANULAR SPHERICAL COLONY STIMULUS FACTOR DERIVATIVE

B12

Patent number: JP4164098
 Publication date: 1992-06-09
 Inventor: ISHIKAWA MASATOSHI; OKADA YUJI; MATSUKI SHIGERU
 Applicant: KIRIN AMGEN INC
 Classification:
 - international: A61K37/02; C07K3/08; C07K13/00; C12N15/27; C12P21/02
 - european:
 Application number: JP19900418953 19901214
 Priority number(s): JP19900418953 19901214; JP19900056291 19900307

Abstract not available for JP4164098

```

The Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
1          5          10          15
Asp Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
20          25          30
Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Gln Glu Leu Val
35          40          45
Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Tyr Ala Pro Leu Ser Ser Cys
50          55          60
Pro Ser Gln Ala Leu Glu Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
65          70          75          80
Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Gln Gly Phe Ser
85          90          95
Pro Gln Leu Gly Phe Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp
100          105          110
Phe Ala His Thr Glu Trp Gln Gln Met Gln Glu Leu Gly Phe Ala Pro
115          120          125
Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe
130          135          140
Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe
145          150          155          160
Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
165          170
  
```

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

⑫ 公開特許公報(A)

平4-164098

⑬ Int. Cl.⁵C 07 K 13/00
A 61 K 37/02

識別記号

ZNA
ABY

庁内整理番号

7731-4H
8317-4C
8717-4B

⑭ 公開 平成4年(1992)6月9日

C 12 N 15/00 A*
審査請求 未請求 請求項の数 3 (全13頁)

⑮ 発明の名称 化学修飾顆粒球コロニー刺激因子誘導体

⑯ 特 願 平2-418953

⑰ 出 願 平2(1990)12月14日

優先権主張 ⑱ 平2(1990)3月7日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平2-56291

㉑ 発 明 者 石 川 雅 敏 群馬県前橋市総社町一丁目2番2号 麒麟
 株式会社 医薬開発研究所内

㉒ 発 明 者 岡 田 雄 治 群馬県前橋市総社町一丁目2番2号 麒麟
 株式会社 医薬開発研究所内

㉓ 発 明 者 松 木 滋 群馬県前橋市総社町一丁目2番2号 麒麟
 株式会社 医薬開発研究所内

㉔ 出 願 人 キリン・アムジェン・ アメリカ合衆国、カリフォルニア・91320、サウザンド・
 インコーポレーテッド オークス、オーク・テラス・レイン・1900

㉕ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外2名
 最終頁に続く

㉖ 【要約】

【目的】ヒトG-CSFを体内に投与した時、生体内における血中停滞時間を延長し、その結果、期待し得る薬効の持続性をより高め、熱安定性及び収率を向上させる。

【構成】以下のアミノ酸配列を有する、17位のシステイン【化3】

ンを他のアミノ酸に置換したヒトG-CSFポリペプチド誘導体であって、外来性DNA配列の宿主細胞による発見産物であることを特徴とするポリペプチドに、ポリエチレングリコールを結合して化学修飾蛋白質とする。前記他のアミノ酸としては、アラニンが好ましい。

(Met)s

Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro	Glu
Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	X	Leu	Glu	Glu	Val	Arg
Lys	Ile	Glu	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu	Glu	Glu
Lys	Leu	Cys	Ala	Thr	Tyr	Lys	Leu	Cys	His	Pro
Glu	Glu	Leu	Val	Leu	Leu	Gly	His	Ser	Leu	Gly
Ile	Pro	Tyr	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser	Cys	Pro	Ser
Glu	Ala	Leu	Glu	Leu	Ala	Gly	Cys	Leu	Ser	Glu
Leu	His	Ser	Gly	Leu	Phe	Leu	Tyr	Glu	Gly	Leu
Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Ser	Pro	Glu	Leu
Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Glu	Leu	Asp	Val
Ala	Asp	Phe	Ala	Thr	Thr	Ile	Tyr	Glu	Glu	Met
Glu	Glu	Leu	Gly	Met	Ala	Pro	Ala	Leu	Glu	Pro
Thr	Glu	Gly	Ala	Met	Pro	Ala	Phe	Ala	Ser	Ala
Phe	Glu	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Ala
Ser	His	Leu	Glu	Ser	Phe	Leu	Glu	Val	Ser	Tyr
Arg	Val	Leu	Arg	His	Leu	Ala	Glu	Pro		

(XはCysを除くアミノ酸、n=0又は1)

【書類名】 明細書

【発明の名称】 化学修飾顆粒球コロニー刺激因子誘導体

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1のアミノ酸配列（但し、N末端側の先頭に更にMetが結合していてもよく、17番目のXaaはCys以外のアミノ酸を指す）を有し、外来性DNA配列の宿主細胞による発現産物であることを特徴とするポリペプチドにポリエチレングリコールを結合してなる化学修飾蛋白質。

【請求項2】 上記Cys以外のアミノ酸がAlaである請求項1に記載の化学修飾蛋白質。

【請求項3】 ポリエチレングリコールが、ポリペプチドのアミノ酸のアミノ基を介して結合する請求項1または2に記載の化学修飾蛋白質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

この発明は、アミノ酸が置換された顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）ポリペプチド誘導体の化学修飾に関し、この修飾はG-CSFの化学的及び／又は生理学的性質を変えることのできるものである。

【0002】

【従来の技術】

ヒトG-CSFは、造血促進因子の一つであり、ヒト膀胱癌細胞系5637（ATCC HT8-9）の培養液中に存在していることが示されている（ウェルト等；Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 1526-1530, (1985)）。またこの遺伝子をコードするDNA配列が決定され（特表昭63-500636）、遺伝子組換えによるヒトG-CSFの生産が可能となっている。

【0003】

ヒトG-CSFは、通常の造血障害の治療や化学療法又は放射線療法による造血障害の治療、骨髄移植時或は創傷治癒熱症治療及び細菌性炎症治療に有効である（ウェルト等；前述）。

【0004】

一方、一般に生理活性蛋白質を投与した時に、生体内におけるクリアランスが速いために、その薬効が短時間しか得られないことがある。また、蛋白質の疎水性が高い場合には、その安定性に問題が生じる場合がある。

【0005】

この様な血中停滞時間の延長や安定性の改善、或いは抗原性の消失を目的として、ポリエチレングリコールで生理活性蛋白質を修飾する方法が知られている。例えば、特開昭62-289522では、ポリエチレングリコール等で修飾したTNFの免疫原性の低下について開示されている。また、特表昭62-503171では、ポリエチレングリコール等で修飾したIL-2、IFN- β の水溶液中での凝集性の低下、血中半減期の延長、免疫原性の減少が開示されている。この他にもプラスミノーゲン活性化因子（特開昭63-60938）やIL-2、IFN- γ 、SOD（特開昭63-10800）並びにIAP（特開昭63-126900）で、ポリエチレングリコール修飾による血中半減期の延長或は抗原性、免疫原性の消失が開示されている。また、G-CSFについても、ポリエチレングリコール修飾による保存安定性の向上、血中停滞時間の延長等についての報告がなされている（特開平1-316400）。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

ヒトG-CSFを体内に投与した時、生体内における血中停滞時間を延長し、その結果、期待し得る薬効の持続性をより高めること、熱安定性及び収率を向上させることが望まれている。

【0007】

【課題を解決するための手段】

ヒトG-CSFにおけるこの様な問題を解決すべく、本発明者等は検討を重ねた結果、17位のシステインを他のアミノ酸に置換したヒトG-CSFポリペプチド誘導体（以下、単に「G-CSF誘導体」という）にポリエチレングリコールを結合させることによって、上記課題を解決できることを見出し、本発明に到達した。

【0008】

[具体的な説明]

本発明におけるヒトG-C S F誘導体は、遺伝子組換えによって大腸菌、動物細胞等の宿主を形質転換して得た形質転換体から産生せしめ単離精製して得られたものであれば、いずれのものでも使用することができる。しかし、それらの中でも純度良く均質大量に入手できる、配列番号1のアミノ酸配列（但し、N末端側の先頭に更にMet が結合していてもよく、17番目のXaa はCys 以外のアミノ酸を指す）を有する遺伝子組換え大腸菌により産生されたヒトG-C S F誘導体が特に好ましい。更には、N末端側の先頭に更にMet が結合し、かつ、17番目のアミノ酸がアラニンである誘導体（G-C S F-Ala17）が好ましい。

【0009】

本発明において、前記ヒトG-C S F誘導体とポリエチレングリコールとは、ポリペプチドのアミノ酸残基を介して互いに共有結合しているのが好ましい。該残基は遊離アミノ基等を有する任意の反応性アミノ酸であり、活性化されたポリエチレングリコールの反応性基がこれら遊離アミノ基等に連結される。遊離アミノ基を有するアミノ酸残基としてはリジン或いはN末端アミノ酸残基が挙げられる。

【0010】

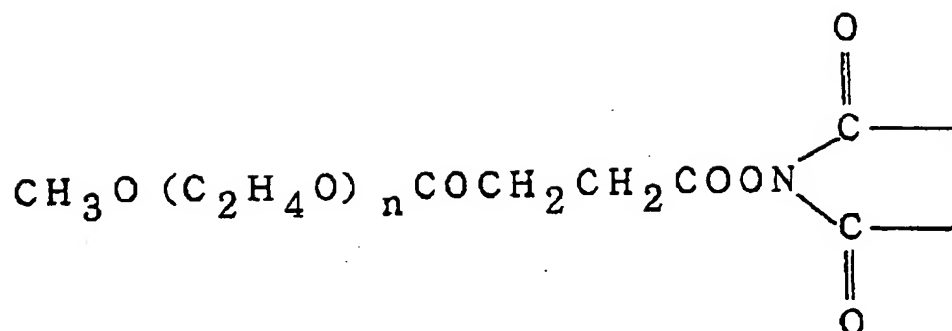
使用するポリエチレングリコールの分子量は特定のものに限定されないが、通常約500～30,000、好ましくは約4,000～20,000のものが用いられる。

【0011】

ポリエチレングリコールは、末端反応性基（スペーサー）を介してヒトG-C S F誘導体上に結合される。スペーサーを有するポリエチレングリコールを、活性型ポリエチレングリコールと称する。スペーサーは、例えば遊離アミノ基とポリエチレングリコールとの結合を仲介するもの等が挙げられる。遊離アミノ基と結合する活性型ポリエチレングリコールとして、例えば次式で表される、

【0012】

【化1】



【0013】

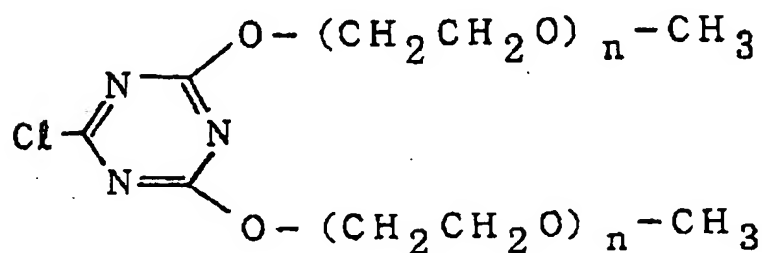
メトキシポリエチレングリコールのコハク酸エステルをN-ヒドロキシスクシンイミドにより活性化したメトキシポリエチレングリコールスクシニミジルスクシネートが使われる。

【0014】

または、ポリエチレングリコールモノメチルエーテルと塩化シアヌール酸より合成された、下式に示す活性型ポリエチレングリコール(2,4-ビス(O-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジン)が使われる。

【0015】

【化2】



【0016】

共有結合修飾反応は、生物学的に活性な材料を活性型ポリエチレングリコールと反応せしめるために一般に使用される適当な任意の方法により実施し得る。ヒ

トG- C S F誘導体上の反応性アミノ酸が遊離アミノ基を有するアミノ酸残基である場合には、好ましくは pH7.5 ~10.0において行われる。該反応は、例えばリン酸塩、ホウ酸塩等の緩衝液中 pH7.5 ~10.0、温度4 ~37℃で1 ~5時間行なう。ヒトG- C S Fの遊離アミノ基に対し、活性型ポリエチレングリコールを1 ~200 倍モル量、好ましくは5 ~50倍モル量用いる。

【0017】

なお、アミノ酸残基の修飾率は、上記の活性型ポリエチレングリコールの使用量に応じ自由に変動させることができる。

【0018】

所望により、反応液は、透析、塩析、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、電気泳動など、通常の蛋白質の精製法で精製し、目的とするポリエチレングリコール修飾ヒトG- C S F誘導体を得ることができる。特にイオン交換クロマトグラフィーは、ポリエチレングリコール及び未修飾のヒトG- C S F誘導体の除去に有効である。また、所望によりイオン交換クロマトグラフィーあるいはゲルろ過クロマトグラフィー等を用いることにより、修飾の程度（結合数）が均一なポリエチレングリコール修飾ヒトG- C S F誘導体を精製することができる。

【0019】

【作用】

本発明のポリエチレングリコール修飾ヒトG- C S F誘導体は、ポリエチレングリコール修飾G- C S F以上に熱安定性の増大や収率の向上などの顕著な効果が認められている。本発明のポリエチレングリコール修飾ヒトG- C S F誘導体は、未修飾ヒトG- C S F誘導体、並びに未修飾ヒトG- C S Fと本質的に同様の生物学的活性を有しているため、未修飾ヒトG- C S Fと同様の用途に有効である。即ち、好中球を増加させるという生物学的活性により、通常の造血障害の治療や化学療法又は放射線療法による造血障害の治療、骨髓移植時或は感染症治療に有効である。

【0020】

ポリエチレングリコール修飾ヒトG- C S F誘導体は、医学上許容可能な希釈

剤、等張化剤、pH調整剤等と調合することにより、患者に投与可能な製剤として用いることができる。

【0021】

ポリエチレングリコール修飾ヒトG-CSF誘導体を有効成分とする製剤の投与方法は、治療目的に応じて変化し得るが、皮下、筋肉内及び静脈への注射、或は経口によって実施される。投与量は、その対象となる疾患及び患者の病状に合わせて決めることができるが、注射の場合はヒトG-CSF誘導体重量として通常成人一人当たり $0.1\mu\text{g} \sim 5\text{mg}$ 、経口の場合には同じく $0.1\text{mg} \sim 5\text{g}$ を投与することができる。

【0022】

【実施例】

以下の実施例で本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

【0023】

実施例1

PEG (4500) G-CSF-Ala17 の作成

後述の参考例で得られた、17番目のシステインがアラニンに置換されたヒトG-CSF誘導体（以下「ヒトG-CSF-Ala17」という）を修飾対象とした。修飾にはポリエチレングリコールを原料とし、そのコハク酸エステルをN-ヒドロキシスクシンイミドにより活性化して得た平均分子量が約4,500のメトキシポリエチレングリコールスクシニミジルスクシネート（日本油脂製）（活性化PEG1と称する）を使用した。

【0024】

ヒトG-CSF-Ala17を0.25Mホウ酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)中で、活性化PEG1と4℃で1時間反応させた。活性化PEG1量は、ヒトG-CSF-Ala17中の遊離アミノ基に対して40倍量を用いた。生成物は、予め10mM NH_4HCO_3 で平衡化させたSephadex G25で緩衝液交換をした後、DEAEイオン交換クロマトグラフィーを用いて、種々の形のポリエチレングリコール修飾G-CSF-Ala17（PEG修飾G-CSF-Ala17）を試薬及び必要に応じ未反

応 G- C S F- Ala17 から分離した。この反応で得られた P E G 修飾 G- C S F 誘導体を、P E G (4500) G- C S F- Ala17 という。

【0025】

反応物を、Laemmli の方法 (Nature, 227, pp. 680 (1970)) に準じて S D S - P A G E を行い、C B B 染色を行なった。染色の後に、各ゲルの各レーンについてスキヤニングを行なった。測定には島津クロマトスキヤナ (C S- 930) を用いた。スキヤニングの結果から求めた平均分子量は47Kであり、その分布は26K (18%)、34K (31%)、54K (31%) 及び74K (20%) であった。なお、これらは、ヒト G- C S F- Ala17 に1分子~多分子の活性型 P E G が結合したものの混合物であり、イオン交換クロマトグラフィー、あるいはゲルろ過クロマトグラフィー等を用いることにより、修飾の程度 (結合数) に応じて更に分離することができる。

【0026】

実施例 2

P E G (10000) G- C S F- Ala17 の作成

修飾対象のヒト G- C S F- Ala17 は、実施例 1 に示したものと同一である。修飾には原料のポリエチレングリコールをポリエチレングリコールモノメチルエーテルとし塩化シアヌール酸と反応させた、化 2 に示す平均分子量約10,000の活性型ポリエチレングリコール (生化学工業製) (活性化 P E G 2 と称する) を使用した。

【0027】

ヒト G- C S F- Ala17 20mg を、0.1 M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.0) 中で、活性化 P E G 2 と室温で1時間反応させた。活性化 P E G 2 量は、ヒト G- C S F 中の遊離アミノ基に対して5倍量を用いた。生成物は、予め10mM NH_4HCO_3 で平衡化させた Sephadex G25 で緩衝液交換をした後、D E A E イオン交換クロマトグラフィーを用いて、P E G 修飾ヒト G- C S F- Ala17 を試薬及び未反応ヒト G- C S F- Ala17 から分離し、P E G 修飾ヒト G- C S F- Ala17 2.3mg (収率11.5%) を得た。同時にヒト G- C S F を活性化 P E G 2 と反応させ、分離し P E G 修飾 G- C S F 1.0 mg (収率5.0 %) を得た。この結果

より、ヒトG- C S F- Ala17の方が、ヒトG- C S Fよりも収率よくP E G修飾体を得られることが判明した。

【0028】

この反応で得られたP E G修飾ヒトG- C S F誘導体を、以降P E G (10000) G- C S F- Ala17 という。反応物について、実施例1と同様にS D S- P A G E上にて分子量の推定を行なったところ、P E G (10000) G- C S F- Ala17 の平均分子量は51Kであり、その分布は30K (23%)、42K (25%)、59K (27%) 及び72K (25%) であった。なお、これらはヒトG- C S F- Ala17 に1分子～多分子の活性型P E Gが結合したものの混合物であり、イオン交換クロマトグラフィー、あるいはゲルろ過クロマトグラフィー等を用いることにより、修飾の程度(結合数)に応じて更に分離した。

【0029】

実施例3

P E G (10000) G- C S F- Ala17 Mono体, Di体及びTri 体の作成

ヒトG- C S F- Ala17 5 mgを、実施例2と同様の条件で活性化P E G 2と反応させ、Sephadex G25及びD E A Eイオン交換クロマトグラフィーを用いて、P E G (10000) G- C S F- Ala17 を得た。これを100 mMリン酸緩衝液、150 mM塩化ナトリウム (pH 7.0) で平衡化したT S K gel- G3000 S W_{XL} (東ソー社製) (7.5 mm×60cm) に、流速1 ml/min でかけた。

【0030】

P E G 2三分子結合体 (Tri 体) は保持時間約15分のあたりに溶出され (収量0.13mg, 収率 2.6%)、P E G 2二分子結合体 (Di体) は保持時間約17分のあたりに溶出され (収量0.16mg, 収率 3.2%)、次いでP E G 2一分子結合体 (Mono体) が保持時間約18分のあたりに溶出された (収量0.12mg, 収率 2.4%)。得られた化学修飾体はMono体ではヒトG- C S F- Ala17 一分子に対し、P E G 2が一分子結合しており、Di体では二分子結合しており、Tri 体では三分子結合していることがS D S- ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認された。それぞれの純度は90%以上であった。

【0031】

実施例4

PEG(4500)G-CSF-Ala17 及びPEG(10000)G-CSF-Ala17 のin vivo での薬理効果

実施例1、2で作成したPEG(4500)G-CSF-Ala17 及びPEG(10000)G-CSF-Ala17 について、マウスにおける薬理効果を調べた。マウス(ICR(♂))7週令に試料を10 μ g protein/kgの用量で静脈内に投与し、24、48及び72時間後にマウスの眼窩静脈叢より採血し、自動血球計数装置(E-2500, 東亜医用電子)にて白血球数を測定した。また、同時に血液塗末標本をライト染色し、自動血球分類装置(MICROX, 立石電機)にて白血球分画を測定し、好中球数を求めた。その結果を、表1に示す。

【0032】

PEG(4500)G-CSF-Ala17、及びPEG(10000)G-CSF-Ala17では、未修飾G-CSF、並びにポリエチレングリコール修飾G-CSFに比べ、好中球数が増加し、48時間、72時間後まで好中球増加作用が持続していることが認められた。また、修飾に用いるPEGの分子量の大きい方が薬理効果が大きいことが推定された。

【0033】

【表1】 PEG修飾G-CSF-Ala17 のin vivo 薬理効果

群	採血時間		
	24時間	48時間	72時間
ベヒクル	9.4(1.5)	11.7(1.2)	11.7(1.8)
G-CSF	22.3(3.4)	11.3(2.1)	9.7(0.9)
G-CSF-Ala17	24.2(2.8)	10.8(1.7)	8.0(0.7)
PEG(4500)G-CSF-Ala17	25.6(6.1)	18.0(2.8)	15.1(1.0)
PEG(10000)G-CSF-Ala17	87.0(7.1)	44.9(4.2)	17.0(1.2)

平均(標準偏差)

*投与量: 10 μ g protein/Kg

*マウスの匹数: 各6匹

実施例 5PEG (10000) G- C S F- Ala17 の熱安定性

実施例 2 で作成した PEG (10000) G- C S F- Ala17 の熱安定性を、PEG (10000) G- C S F と比較した。各試料を濃度 0.1mg/ml となるように、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、53℃ で 6 時間加温した後、溶液中の G- C S F 残存活性を測定した。G- C S F の活性は、P. ラルフらの方法 (ブラッド (1986) 68, 633-639) 及び R. N. ムーアらの方法 (ジャーナル オブ イムノロジー (1983) 131, 2374-2378) に準じて、マウスの骨髄細胞への ^3H - チミジンの取り込みを指標として測定した。その結果を、表 2 に示す。残存活性 (%) は、加温前の初期活性に対する相対割合であり、以下の式で定義される。

【0034】

【数 1】 残存活性 (%) = (加温後の活性) / (初期活性) × 100

PEG (10000) G- C S F- Ala17 は、PEG (10000) G- C S F に比べ、残存活性が高く、熱安定性が向上している事が確認された。

【0035】

【表 2】 PEG (10000) G- C S F- Ala17 の熱安定性 (53℃、6 hr)

試料	残存活性 (%)
PEG (10000) G- C S F	8
PEG (10000) G- C S F- Ala17	61

(10mM リン酸緩衝液、pH7.0)

参考例

17位のシステインをアラニンに置換した G- C S F 誘導体 (G- C S F- Ala17) を以下のようにして得た。

【0036】

上記の G- C S F 誘導体をコードする DNA を含むプラスミド p S A 2116 (特開平2-104598) を保有する大腸菌 (p S A 2116 / AM7) を、アンピシリン及びカナマイシンを含む L 培地にて 28℃ で一晩振盪培養した。この培養液 25ml を 500 ml の L 培地に加え、28℃ で 4 時間、振盪培養した。予め 60℃ にしておいた L 培地

500mlを培養液に加え、42℃にして更に3時間振盪培養した。

【0037】

更に培養液を遠心分離して約20gの菌体を得た。140mlの蒸留水を加え懸濁した後、最終濃度1mMとなる様に1MDTTを加えた。この間溶液は4℃に保持した。フレンチプレスを用いて菌体を破碎し、沈澱を集めた。この沈澱から、タナカらの方法 [H. Tanaka ら：The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 251, 1199(1990)] によりG-CSF誘導体を抽出・精製・可溶化・再生した。

【0038】

【発明の効果】

以上の結果より本発明が提供するポリエチレングリコール修飾ヒトG-CSF誘導体は、未修飾G-CSF及び未修飾G-CSF-Ala17と比較して、血中半減期が伸長し、薬効（好中球の増加作用）がより長く持続することにより、生体内投与の際に、より少量でのより少ない回数の投与が可能となった。また、本発明のポリエチレングリコール修飾ヒトG-CSF誘導体は、ポリエチレングリコール修飾G-CSFと比較して、収率が向上しており、更には熱安定性の向上が認められた。これら発明の効果は、ヒトG-CSFを用いた治療に一層貢献し得ることが期待される。

【0039】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：174

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1 5 10 15

Xaa Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

	20	25	30
Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val			
35	40	45	
Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys			
50	55	60	
Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser			
65	70	75	80
Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser			
85	90	95	
Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp			
100	105	110	
Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro			
115	120	125	
Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe			
130	135	140	
Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe			
145	150	155	160
Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro			
165	170		

第1頁の続き

⑤Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号
C 07 K 3/08		7731-4H
// C 12 N 15/27		
C 12 P 21/02	H	8214-4B
(C 12 P 21/02		
C 12 R 1:19)		